

## 明 細 書

## WT 1 ワクチン適応患者の選択方法

## 5 技術分野

本発明は、WT 1 ワクチン応答性が高い患者の選択方法およびそれを包含する癌の処置方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、WT 1 特異的CTL前駆細胞の頻度を指標とした、WT 1 ワクチン応答性が高い患者の選択方法などに関する。

10

## 背景技術

15

WT 1 遺伝子 (Wilms' tumor gene 1) は、小児の腎腫瘍であるWilms腫瘍の原因遺伝子の1つとして同定された (Cell 60: 509, 1990、Nature 343: 774, 1990)。WT 1 遺伝子は転写因子WT 1 をコードしており、WT 1 は細胞の増殖・分化・アポトーシス及び臓器の形成などに関する重要な働きをする

20

(Int. Rev. Cytol. 181: 151, 1998)。当初、WT 1 遺伝子は、癌抑制遺伝子と位置付けられていたが、その後の研究により白血病及び肺癌や乳癌を含む種々の固形癌で発現が認められ、むしろ癌の増殖を促進する癌遺伝子としての作用を有することが示された。また、WT 1 由来のペプチドでHLA-A\* 0201陽性またはHLA-A\* 2402陽性の末梢血単核球をin vitroで刺激することにより、ペプチド特異的な細胞傷害性T細胞 (CTL) が誘導され、これらのCTLは、内因性にWT 1 を発現する白血病や固形癌の癌細胞を傷害することが示された。これらの結果より、WT 1 は癌免疫療法の有望な標的分子であることが示された (Int. J. Hematol 76: 127, 2002)。

25

抗原ペプチド特異的なCTLを in vitroで定量する方法としては、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法 (Science 274: 94, 1996)、HLAペンタマー法、ELISPOT法 (J. Immunol. Methods 110: 29, 1988)、リアルタイムRT-PCR法 (J. Immunol. Methods 210: 195, 1997)、限界希釈法 (Br. J. Cancer 77: 1907, 1998) などが知られている。HLA-テトラマーは、HLA $\alpha$ 鎖と $\beta_2$ ミクログロ

5  
プリンをペプチドと会合させた複合体（HLAモノマー）をビオチン化し、蛍光標識したアビジンに結合させることにより4量体化して作製する。HLAテトラマーでペプチド特異的CTLを染色し、フローサイトメーターで解析することによりCTLの頻度を測定することができる。HLAモノマー法、HLAタイマー法及びHLAペンタマー法も同様の原理に基づきCTLの頻度を測定することができる。

ワクチンによる刺激前のCTLをCTL前駆細胞（プリカーサー）と称している。特定の癌抗原に対するCTL前駆細胞の存在頻度が高ければ、癌ワクチンとしてその抗原を投与した場合に効率良く特異的なCTLが誘導され、癌ワクチン療法による奏効が得られやすいと考えられる。すなわち、特定の癌抗原に特異的なCTL前駆細胞の存在頻度の高い患者をワクチン投与前に選択することが可能であれば、その癌抗原を用いたより効果的な治療を行うことが可能となる。

10  
15  
しかしながら、メラノーマ患者の末梢血単核球（PBMC）を用いたHLAテトラマーによるCTL前駆細胞の頻度測定についてはいくつかの報告がなされているが、癌抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞の頻度は低値であることが示されている（J. Immunother. 24: 66, 2001、Hum. Gene. Ther. 13: 569, 2002）。このようなことから、抗原に対するCTL前駆細胞の存在頻度は一般的に低いと考えられており、CTL前駆細胞の存在頻度を指標として癌ワクチンの適応患者を選択することは困難であると考えられていた。

## 20 発明の開示

本発明の目的は、WT1特異的CTL前駆細胞の頻度を指標とした、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法などを提供することにある。

25  
本発明者は、WT1由来の癌抗原ペプチドを用いてHLAテトラマーを作製し、造血器悪性腫瘍及び肺癌の患者のワクチン投与前のCTL前駆細胞の頻度を測定したところ、驚くべきことに、健常人に比べて、従来にない高い頻度でCTL前駆細胞（WT1特異的なCTL前駆細胞）が存在していることを見出した。このことから癌抗原WT1に関しては、WT1特異的なCTL前駆細胞の頻度を指標として、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択やWT1ワクチンの標的分子の同定を行えることが明らかとなった。また前記の如き種々の癌患者においてWT1特異的CTL前駆細胞の頻度が高

かったことから、WT1特異的CTL前駆細胞の頻度を指標として、癌の診断を行えることも明らかとなった。

本発明者はさらに、WT1特異的CTL前駆細胞を機能的に細分類したところ、CTL前駆細胞の中でも、特にエフェクター型CTL前駆細胞（以下、単にエフェクター細胞とも称する）の占める割合が高いことを見出した。従ってWT1特異的なエフェクター型CTL前駆細胞の存在頻度を指標として、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択や癌の診断が行えることも明らかとなった。

さらに本発明者は、WT1由来の癌抗原ペプチドによる治療実施中の患者におけるWT1特異的CTLの頻度を測定したところ、ペプチド投与前に対するペプチド投与後のCTL頻度の増加と治療効果とが相関していることを見出した。

本発明は、以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

すなわち本発明は、

(1) 以下の工程 (a)、(b) および (c) :

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

(b) 前記 (a) の生体試料中に存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、

(c) 前記 (b) の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチン応答性を判断する工程、

を含む、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法；

(2) WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペンタマー法、エリスポット法、リアルタイムRT-PCR法および限界希釈法のいずれかの方法により測定する、前記 (1) 記載の選択方法；

(3) HLAテトラマー法により測定する、前記 (2) 記載の選択方法；

(4) 以下の工程 (a)、(b)、(c) および (d) :

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

(b) WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーと、前記 (a) の生体試料とを接触させる工程、

(c) HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度ま

たは量を測定する工程、

(d) 前記(c)の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチン応答性を判断する工程、

を含む、前記(3)記載の選択方法；

5 (5) 前記(4)に記載の工程(c)が、CD8陽性またはCD8/CD3陽性のCTL前駆細胞中でのHLAテトラマー結合細胞の割合を測定することにより行われる、前記(4)記載の選択方法；

(6) HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、前記(4)または(5)記載の選択方法；

10 (7) WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)および Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5)より選択される、前記(4)～(6)いずれか記載の選択方法；

15 (8) フローサイトメトリーを用いて行われる前記(1)～(7)いずれか記載の選択方法；

(9) WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量が、健常人の値と比較して1.5倍以上高いことを指標としてWT1ワクチン応答性を判断する、前記(1)～(8)いずれか記載の選択方法；

20 (10) CTL前駆細胞がエフェクター型CTL前駆細胞である、前記(1)記載の選択方法；

(11) WT1特異的なエフェクター型CTL前駆細胞の存在頻度または量の測定に、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペンタマー法、エリスポット法、リアルタイムRT-PCR法および限界希釈法の  
15 いずれかの方法を利用する、前記(10)記載の選択方法；

(12) HLAテトラマー法を利用する、前記(11)記載の選択方法；

(13) 以下の工程(a)、(b)、(c)および(d)：

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

(b) WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマー、抗CD8抗体、

抗CD45RA抗体および抗CD27抗体と、前記(a)の生体試料とを接触させる工程、

(c) CD8陽性またはCD8/CD3陽性であり、かつHLAテトラマー結合陽性のCTL前駆細胞中での、CD45RA陽性かつCD27陰性のエフェクター型CTL前駆細胞の割合を測定する工程、

(d) 前記(c)の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチン応答性を判断する工程、

を含む、前記(12)記載の選択方法；

(14) HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、前記(13)記載の選択方法；

(15) WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)および Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5) より選択される、前記(13) または

(14) 記載の選択方法；

(16) フローサイトメトリーを用いて行われる前記(10)～(15)いずれか記載の選択方法；

(17) 以下の工程(a)、(b)および(c)；

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験者より単離する工程、

(b) 前記(a)の生体試料中に存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、

(c) 前記(b)の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、癌の罹患を判断する工程、

を含む、癌の診断方法；

(18) WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペンタマー法、エリスポット法、リアルタイムRT-PCR法および限界希釈法のいずれかの方法により測定する、前記(17)記載の診断方法；

(19) HLAテトラマー法により測定する、前記(18)記載の診断方法；

(20) 以下の工程 (a)、(b)、(c) および (d) :

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験者より単離する工程、

(b) WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーと、前記(a)の生体試料とを接触させる工程、

5 (c) HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、

(d) 前記(c)の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、癌の罹患を判断する工程、

を含む、前記(19)記載の診断方法；

10 (21) 前記(20)に記載の工程(c)が、CD8陽性またはCD8/CD3陽性のCTL前駆細胞中でのHLAテトラマー結合細胞の割合を測定することにより行われる、前記(20)記載の診断方法；

(22) HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、前記(20)または(21)記載の診断方法；

5 (23) WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)および Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5)より選択される、前記(20)～(22)いずれか記載の診断方法；

10 (24) フローサイトメトリーを用いて行われる前記(17)～(23)いずれか記載の診断方法；

(25) WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量が、健常人の値と比較して1.5倍以上高いことを指標として癌の罹患を判断する、前記(17)～(24)いずれか記載の診断方法；

5 (26) CTL前駆細胞がエフェクター型CTL前駆細胞である、前記(17)記載の診断方法；

(27) WT1特異的なエフェクター型CTL前駆細胞の存在頻度または量の測定に、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペンタマー法、エリスポット法、リアルタイムRT-PCR法および限界希釈法の

いずれかの方法を利用する、前記（２６）記載の診断方法；

（２８） HLAテトラマー法を利用する、前記（２７）記載の診断方法；

（２９） 以下の工程（ａ）、（ｂ）、（ｃ）および（ｄ）；

（ａ）CTL前駆細胞を含む生体試料を被験者より単離する工程、

（ｂ）WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマー、抗CD8抗体、  
抗CD45RA抗体および抗CD27抗体と、前記（ａ）の生体試料とを接触さ  
せる工程、

（ｃ）CD8陽性またはCD8／CD3陽性であり、かつHLAテトラマー結合  
陽性のCTL前駆細胞中での、CD45RA陽性かつCD27陰性のエフェクタ  
ー型CTL前駆細胞の割合を測定する工程、

（ｄ）前記（ｃ）の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、癌  
の罹患を判断する工程、

を含む、前記（２８）記載の診断方法；

（３０） HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原  
またはHLA-A2抗原である、前記（２９）記載の診断方法；

（３１） WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn  
Leu（配列番号：２）、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：３）、  
Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu（配列番号：４）および Arg Tyr Pro Ser  
Cys Gln Lys Lys Phe（配列番号：５）より選択される、前記（２９）または

（３０）記載の診断方法；

（３２） フローサイトメトリーを用いて行われる前記（２６）～（３１）いず  
れか記載の診断方法；

（３３） 以下の工程（ａ）～（ｄ）；

（ａ）CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

（ｂ）前記（ａ）の生体試料に複数のWT1ワクチンの標的分子をそれぞれ適用  
し、

（ｃ）前記（ｂ）の生体試料中それぞれに存在するWT1特異的なCTL前駆細  
胞の存在頻度または量を測定し、それぞれ比較する工程、

（ｄ）前記（ｃ）の測定結果に基づいて、その患者に有効なWT1ワクチンの標

的分子を同定する工程、

を含む、患者固有のWT 1 ワクチン標的分子の同定方法；

(34) WT 1 特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペンタマー法、エリスポット法、リアルタイムRT-PCR法および限界希釈法のいずれかの方法により測定する、前記(33)記載の同定方法；

(35) HLAテトラマー法により測定する、前記(34)記載の同定方法；

(36) 以下の工程(a) - (d)：

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

(b) WT 1 由来の複数の癌抗原ペプチドを含有する複数のHLAテトラマーと、前記(a)の生体試料とをそれぞれ接触させる工程、

(c) HLAテトラマーに結合したWT 1 特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量をそれぞれ測定し、比較する工程、

(d) 前記(c)の測定結果に基づいて、その患者に有効なWT 1 由来の癌抗原ペプチドを同定する工程、

を含む、前記(35)記載の同定方法；

(37) 前記(36)に記載の工程(c)が、CD8陽性またはCD8/CD3陽性のCTL前駆細胞中でのHLAテトラマー結合細胞の割合を測定することにより行われる、前記(36)記載の同定方法；

(38) HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、前記(36)または(37)記載の同定方法；

(39) WT 1 由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)および Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5) より選択される、前記(36)～(38)いずれか記載の同定方法；

(40) フローサイトメトリーにより行われる前記(33)～(39)いずれか記載の同定方法；

(41) WT 1 由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAモノマー、HLAダイ



マー、HLAテトラマーまたはHLAペンタマーを成分とする、WT1ワクチン  
応答性が高い患者の選択のための臨床検査薬；

(42) HLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペ  
ンタマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2  
5 抗原である、前記(41)記載の臨床検査薬；

(43) WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn  
Leu (配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、  
Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)および Arg Tyr Pro Ser  
Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5) より選択される、前記(41)または

10 (42)に記載の臨床検査薬；

(44) 前記(41)～(43)いずれか記載の臨床検査薬を含有するキッ  
ト；

(45) 前記(33)～(40)いずれか記載の患者固有のWT1ワクチン標  
的分子の同定方法により同定された標的分子を含有する、患者固有の癌を処置す  
15 るための当該患者用の医薬組成物；

(46) WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAモノマー、HLAダイ  
マー、HLAテトラマーまたはHLAペンタマーを成分とする、癌の診断薬；

(47) HLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペ  
ンタマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2  
20 抗原である、前記(46)記載の診断薬；

(48) WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn  
Leu (配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、  
Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)および Arg Tyr Pro Ser  
Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5) より選択される、前記(46)または

25 (47)に記載の診断薬；

(49) 前記(46)～(48)いずれか記載の診断薬を含有するキット；

(50) 以下の工程(a)、(b)および(c)；

(a) CTLを含む生体試料をWT1ワクチン投与後の患者より単離する工程、

(b) 前記(a)の生体試料中に存在するWT1特異的なCTLの存在頻度また

は量を測定する工程、

(c) 前記 (b) の測定結果を WT 1 ワクチン投与前のそれと比較して高いか否かを判定し、WT 1 ワクチンによる治療の適合性を判断する工程、を含む、該患者における該 WT 1 ワクチンの適合性を判定する方法；

5 (5 1) WT 1 特異的な CTL の存在頻度または量を、HLA モノマー法、HLA ダイマー法、HLA テトラマー法、HLA ペンタマー法、エリスポット法、リアルタイム RT-PCR 法および限界希釈法のいずれかの方法により測定する、前記 (5 0) 記載の判定方法；

(5 2) HLA テトラマー法により測定する、前記 (5 1) 記載の判定方法；

10 (5 3) 以下の工程 (a)、(b)、(c) および (d)：

(a) CTL を含む生体試料を WT 1 ワクチン投与後の患者より単離する工程、

(b) WT 1 由来の癌抗原ペプチドを含有する HLA テトラマーと、前記 (a) の生体試料とを接触させる工程、

15 (c) HLA テトラマーに結合した WT 1 特異的な CTL の存在頻度または量を測定する工程、

(d) 前記 (c) の測定結果を WT 1 ワクチン投与前のそれと比較して高いか否かを判定し、WT 1 ワクチンによる治療の適合性を判断する工程、を含む、前記 (5 2) 記載の判定方法；

20 (5 4) 前記 (5 3) に記載の工程 (c) が、CD 8 陽性または CD 8 / CD 3 陽性の CTL 中での HLA テトラマー結合細胞の割合を測定することにより行われる、前記 (5 3) 記載の判定方法；

(5 5) HLA テトラマーの構成成分である HLA 抗原が HLA-A 2 4 抗原または HLA-A 2 抗原である、前記 (5 3) または (5 4) 記載の判定方法；

25 (5 6) WT 1 由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4) および Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5) より選択される、前記 (5 3) ～ (5 5) いずれか記載の判定方法；

(5 7) フローサイトメトリーを用いて行われる前記 (5 0) ～ (5 6) いず

れか記載の判定方法；

(58) WT1特異的なCTLの存在頻度または量が、WT1ワクチン投与前の値と比較して1.5倍以上高いことを指標としてWT1ワクチンによる治療が適しているか否かを判断する、前記(50)～(57)いずれか記載の判定方法；

(59) WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペンタマーを成分とする、WT1ワクチンの適合性の判定のための臨床検査薬；

(60) HLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペンタマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、前記(59)記載の臨床検査薬；

(61) WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)および Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5) より選択される、前記(59)または(60)に記載の臨床検査薬；ならびに

(62) 前記(59)～(61)いずれか記載の臨床検査薬を含有するキット、に関する。

さらに、本発明は、

(63) 前記(1)に関連し、以下の工程(a)、(b)および(c)：

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

(b) 前記(a)の生体試料中に存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、

(c) 前記(b)の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチン応答性を判断する工程、により、WT1ワクチン応答性が高い患者を選択し、該選択された患者をWT1またはWT1由来の癌抗原ペプチドにより処置する、該患者における癌を処置する方法、および前記(2)～(16)いずれか記載の選択方法により選択された患者における癌を処置する方法；

(64) 前記(33)に関連し、以下の工程(a)～(d)：

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

(b) 前記(a)の生体試料に複数のWT1ワクチンの標的分子をそれぞれ適用し、

(c) 前記(b)の生体試料中それぞれに存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定し、それぞれ比較する工程、

(d) 前記(c)の測定結果に基づいて、その患者に有効なWT1ワクチンの標的分子を同定する工程、

を含む、患者固有のWT1ワクチン標的分子の同定方法により同定された標的分子を投与する、当該患者固有の癌を処置する方法、および前記(34)～(40)いずれか記載の患者固有のWT1ワクチン標的分子の同定方法により同定された標的分子を投与する、当該患者固有の癌を処置する方法；

(65) 前記(50)に関連し、以下の工程(a)、(b)および(c)：

(a) CTLを含む生体試料をWT1ワクチン投与後の患者より単離する工程、

(b) 前記(a)の生体試料中に存在するWT1特異的なCTLの存在頻度または量を測定する工程、

(c) 前記(b)の測定結果をWT1ワクチン投与前のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチンによる治療の適合性を判断する工程、

を含む、該患者における該WT1ワクチンの適合性を判定する方法により適合性ありと判定された患者を、WT1またはWT1由来の癌抗原ペプチドにより処置する、該患者における癌を処置する方法、および前記(51)～(58)いずれか記載の判定方法により、適合性ありと判定された患者における癌を処置する方法；

に関する。

## 図面の簡単な説明

図1は、癌患者と健常人におけるWT1特異的CTL前駆細胞の存在頻度を示すグラフである。図中、縦軸はCTL前駆体（前駆細胞）の頻度を示す。また図中、血液癌はHLA-A2402陽性の造血器悪性腫瘍患者の結果を、肺癌はHLA-A2402陽性の肺癌患者の結果を、健常人はHLA-A2402陽性の健常人の結果をそれぞれ示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、以下の工程（a）、（b）および（c）：

（a）CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

5 （b）前記（a）の生体試料中に存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、

（c）前記（b）の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチン応答性を判断する工程、

10 を含む、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法、および該方法により選択された患者における癌を処置する方法を提供する。

本発明においては、ワクチン投与前の癌患者において、従来にない高い頻度でWT1特異的なCTL前駆細胞が存在していることを見出した。従ってWT1特異的なCTL前駆細胞の量や頻度を指標として、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択を行うことができる。

15 工程（a）における被験患者とは、癌の疑われる患者、若しくは癌患者を指す。具体的には、白血病、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌が疑われる患者、若しくはこれらの癌に罹患した患者が例示される。好ましくは白血病、骨髓異形成症候群および  
20 肺癌が疑われる患者、若しくはこれらの癌に罹患した患者が挙げられる。

工程（a）において被験患者より単離される生体試料は、CTL前駆細胞を含む限り特に制限はないが、血液、リンパ液またはこれらの培養物、血液から単離した末梢血単核球（PBMC）、若しくはT細胞が浸潤した組織などが例示される。生体試料は、そのまま使用することもできるし、希釈または濃縮して使用すること  
25 もできる。好ましくはPBMCが用いられ、当該PBMCは通常のFicoll-Hypaqueの密度勾配遠心法などにより単離することができる。

工程（b）において生体試料中に存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する手法は、CTLの存在頻度または量を測定できる従来公知の如何なる手法を用いても良い。具体的には、例えばHLAモノマー法、HLAダイ

マー法、HLAテトラマー法、HLAペンタマー法、エリスポット法、リアルタイムRT-PCR法または限界希釈法などを用いることができる。

ここでHLAテトラマー法とは、HLA抗原 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 2ミクログロブリンを目的抗原ペプチドと会合させた複合体（HLAモノマー）をビオチン化し、蛍光標識したアピジンに結合させることにより4量体化して作製したHLAテトラマーを用いて、  
5 抗原ペプチド特異的CTLを検出する方法である。具体的には、当該HLAテトラマーで抗原ペプチド特異的なCTLを染色し、フローサイトメーターで解析することにより当該CTLを定量することができる。このようなHLAテトラマーの製造方法およびそれを用いたCTLの検出方法は公知であり、例えば文献（Science 274: 94,  
10 1996）に記載の方法に準じて行うことができる。

HLAモノマー法とは前記HLAテトラマーの製造において用いられるHLAモノマー（HLA抗原 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 2ミクログロブリン、抗原ペプチドの会合体をビオチン化したもの）を用いて抗原ペプチド特異的CTLを検出する方法である。

HLAダイマー法とはHLA抗原 $\alpha$ 鎖とIg（イムノグロブリン、例えばIgG1）とを融合させ、これに $\beta$ 2ミクログロブリン、抗原ペプチドを結合させたHLAダイマーを用いて、抗原ペプチド特異的CTLを検出する方法である  
15

（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6671-6675 (1993)）。HLAダイマーに結合した抗原ペプチド特異的CTLは、例えば標識抗IgG1抗体をIgG1に結合させることなどにより、検出することができる。

HLAペンタマー法とは近年開発された手法であり、HLA抗原と抗原ペプチドとの複合体5分子がCoiled-Coilドメインを介して重合した5量体により、抗原ペプチド特異的CTLを検出する方法である。HLA抗原-抗原ペプチドの複合体を蛍光色素等で標識することができるため、HLAテトラマー法と同様にフローサイトメーター等で解析することができる（<http://www.proimmune.co.uk/>参照）。  
20

以上に述べたHLAモノマー、ダイマー、テトラマーおよびペンタマーはいずれも受託合成可能であり、例えばProImmune社やBD Biosciences社などに委託することにより合成することができる。  
25

エリスポット法とは、活性化CTLが産生するIFN- $\gamma$ 、GM-CSF等のサイトカインに対する抗体をプレート上に固相化し、目的抗原若しくは目的抗原ペプチドで刺

5 激した生体試料をプレートに添加し、前記固相化抗体に結合した生体試料中の活性化CTLが分泌したサイトカインを抗サイトカイン抗体でスポットとして検出することにより、生体試料中のCTLを検出する方法である。当該エリスポット法を用いたCTLの定量法は公知であり、例えば文献（J. Immunol. Methods 110: 29, 1988）に記載の方法に準じて行うことができる。

リアルタイムRT-PCR法とは、活性化CTLが産生するIFN- $\gamma$ 、GM-CSF等のサイトカインの遺伝子量をRT-PCRにより測定することにより、間接的に、目的抗原若しくは目的抗原ペプチド反応性のCTL頻度を測定する方法である。当該リアルタイムRT-PCR法を用いたCTLの定量法は公知であり、例えば文献（J. Immunol. Methods 210: 195, 1997）に記載の方法に準じて行うことができる。

15 限界希釈法とは、CTLを含む生体試料を細胞密度を変えてプレートに播種し、目的抗原若しくは目的抗原ペプチドで刺激しながら培養して、活性化CTLが産生するサイトカイン量や細胞傷害性を測定し、陽性ウェル数からCTL頻度を測定する方法である。当該限界希釈法を用いたCTLの定量法は公知であり、例えば文献（Br. J. Cancer 77: 1907, 1998）に記載の方法に準じて行うことができる。

以上のような公知のCTL定量法を用いることにより、WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定することができる。

20 工程（c）におけるWT1ワクチン応答性の判断は、工程（b）で得られた被験患者におけるWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量（以下被験患者値という）を、健常人のそれ（健常人値）と比較し、両者の違いを判定することによって行うことができる。この場合、健常人から単離・調製した生体試料（血液、リンパ液、PBMC等）が必要であるが、これらは癌に罹患していない人の生体試料を採取することによって、取得することができる。なお、ここでいう「健常人」とは、癌と診断されていない人をいう。

25 被験者値と健常人値との比較は、被験者の生体試料と健常人の生体試料を対象とした測定を並行して行うことで実施できる。並行して行わない場合は、複数（少なくとも2つ、好ましくは3以上、より好ましくは5以上）の健常人の生体試料を用いて均一な測定条件で測定して得られた健常人値の平均値または統計的中間値を比較に用いることができる。

被験患者においてWT1ワクチン応答性が高いか否かの判断は、被験者値が健常人値と比較して1.5倍以上、好ましくは2倍以上多いことを指標として行うことができる。すなわち、被験者値が健常人値と比較して1.5倍以上、好ましくは2倍以上多ければ、WT1ワクチン応答性が高いと判断する。WT1ワクチン応答性が高いと判断された患者は、WT1ワクチンが適用可能、即ちWT1ワクチンによる治療を良好に適用できると判断される。

前記CTLの測定法のうち、手法の容易さおよび精度の観点から最も好ましいのはHLAテトラマー法である。すなわち好ましい形態として、本発明は、HLAテトラマー法を用いることを特徴とするWT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法および処置方法を提供する。なお前述のように、HLAモノマー法、HLAダイマー法およびHLAペンタマー法も原理的にはHLAテトラマー法と同様の手法であり、好ましいCTLの測定法であるが、ここではHLAテトラマー法を例にとり説明する。

当該HLAテトラマーを用いたWT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法および処置方法は、具体的には以下の工程（a）、（b）、（c）および（d）：

- （a）CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、
  - （b）WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーと、前記（a）の生体試料とを接触させる工程、
  - （c）HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、
  - （d）前記（c）の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチン応答性を判断する工程、
- を含むものである。

ここで工程（a）における「生体試料」および「被験患者」は、前記した通りである。

工程（b）において用いられる「HLAテトラマー」とは、HLA抗原の $\alpha$ 鎖と $\beta$ 2ミクロglobulinをペプチド（抗原ペプチド）と会合させた複合体（HLAモノマー）をビオチン化し、アビジンに結合させることにより4量体化したものを指す（Science 279: 2103-2106(1998)、Science 274: 94-96 (1996)）。当該HLAテトラマーは、フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡等の公知の検出手段により結合し



たCTL前駆細胞を容易に選別または検出することが出来るように、蛍光標識されていることが好ましい。具体的には、例えばフィコエリスリン (PE)、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、ペリジニクロロフィルプロテイン (PerCP)、アロフィコシアニン (APC)、フィコエリスリン-テキサスレッド (ECDとも称する)、フィコエリスリン-シアニン5.1 (PC5とも称する) などにより標識されたHLAテトラマーが挙げられる。

前記HLAテトラマーの成分として用いられるWT1由来の癌抗原ペプチドは、ヒトWT1 (Cell, 60:509, 1990、NCBIデータベースAccession No. XP\_034418、配列番号: 1) に由来し、HLA抗原と複合体を形成してHLA拘束性の細胞傷害性T細胞 (CTL) の誘導活性 (免疫原性) を有するものである。

HLA分子には多くのサブタイプが存在し、結合できる癌抗原ペプチドのアミノ酸配列にはそれぞれのタイプについて規則性 (結合モチーフ) が存在することが知られている (Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155:p4749, 1995)。例えばHLA-A24の場合、8~11アミノ酸からなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン (Tyr)、フェニルアラニン (Phe)、メチオニン (Met) またはトリプトファン (Trp) であり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン (Phe)、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、トリプトファン (Trp) またはメチオニン (Met) となることが知られている (J. Immunol., 152, p3913, 1994、Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155, p4307, 1994)。

またHLA-A2のモチーフについては、以下の表1に示したモチーフが知られている (Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155:p4749, 1995)。

表1

HLA-A2のタイプ	N末端から2番目のアミノ酸	C末端のアミノ酸
HLA-A0201	L, M	V, L
HLA-A0204	L	L
HLA-A0205	V, L, I, M	L
HLA-A0206	V, Q	V, L
HLA-A0207	L	L

(ペプチドの長さは8~11アミノ酸)

さらに近年、HLA抗原に結合可能と予想されるペプチド配列を、インターネット上、NIHのBIMASのソフトを使用することにより検索することができる

([http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/))。またBIMAS HLA peptide binding prediction analysis(J. Immunol., 152, 163, 1994)を用いて検索することも可能である。このようにして検索・同定されたWT1由来ペプチドの具体例としては、例えば国際公開第2000/18795号パンフレットのTableII～TableXLVIに列挙されたペプチドが挙げられる。

以上のようなWT1由来のペプチドは、そのアミノ酸残基の一部に改変（置換、欠失、及び／又は付加（ペプチドのN末端、C末端へのアミノ酸の付加も含む））を有していても良く、好ましくはアミノ酸残基の置換が挙げられる。当該置換は前記モチーフ上とり得るアミノ酸残基への置換が望ましい。

以上のようなWT1由来のペプチド（改変体も含む）を、公知の癌抗原ペプチドのアッセイ法（例えばWO 02/47474号公報、Int J. Cancer: 100, 565-570 (2002)等参照）に供することにより、WT1由来の癌抗原ペプチドを選択することができる。

WT1由来の癌抗原ペプチドの具体例としては、例えば以下のペプチドが例示される：

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2)

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5)

Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：6)

Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：7)

Abu Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：8)

Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：9)

Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：10)

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：11)

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：12)

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号：13)

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号 : 14)

Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号 : 15)

Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe (配列番号 : 16)

Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe (配列番号 : 17)

5 Arg Tyr Pro Ser Abu Gln Lys Lys Phe (配列番号 : 18)

(ここでAbuは $\alpha$ -アミノ酪酸である)

このうち配列番号 : 2および配列番号 : 4に記載のペプチドはHLA-A24抗原およびHLA-A2抗原に結合性のペプチドであり、またそれ以外のペプチド (配列番号 : 3、5、6~18) はHLA-A24抗原に結合性のペプチドである。

10 好ましくは、前記配列番号 : 2、配列番号 : 3、配列番号 : 4および配列番号 : 5 のいずれかに記載の癌抗原ペプチドが挙げられる。

前記ペプチドは、1つのHLAテトラマー中に2種以上含有されていてもよい。

15 前記ペプチドは、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて合成することができる。合成方法としては、文献 (ペプタイド・シンセシス (Peptide Synthesis) , Interscience, New York, 1966 ; ザ・プロテインズ (The Proteins) , Vol 2 , Academic Press Inc. , New York, 1976 ; ペプチド合成, 丸善 (株) , 1975 ; ペプチド合成の基礎と実験, 丸善 (株) , 1985 ; 医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991) などに記載されている方法が挙げられる。

20 前記ペプチドは、そのN末端アミノ酸のアミノ基またはC末端アミノ酸のカルボキシル基を修飾したペプチドであってもよい。

25 ここでN末端アミノ酸のアミノ基の修飾基としては、例えば1~3個の炭素数1から6のアルキル基、フェニル基、シクロアルキル基、アシル基が挙げられ、具体的には炭素数1から6のアルカノイル基、フェニル基で置換された炭素数1から6のアルカノイル基、炭素数5から7のシクロアルキル基で置換されたカルボニル基、炭素数1から6のアルキルスルホニル基、フェニルスルホニル基、炭素数2から6のアルコキシカルボニル基、フェニル基で置換されたアルコキシカルボニル基、炭素数5から7のシクロアルコキシで置換されたカルボニル基、フェノキシカルボニル基等が挙げられる。

C末端アミノ酸のカルボキシル基の修飾基としては、例えばエステル基およびアミド基が挙げられ、エステル基の具体例としては、炭素数1から6のアルキルエステル基、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキルエステル基、炭素数5から7のシクロアルキルエステル基等が挙げられ、アミド基の具体例としては、アミド基、炭素数1から6のアルキル基1つまたは2つで置換されたアミド基、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキル基1つまたは2つで置換されたアミド基、アミド基の窒素原子を含んで5から7員環のアザシクロアルカンを形成するアミド基等が挙げられる。

HLAテトラマーの成分であるHLA抗原（HLA抗原の $\alpha$ 鎖）は、如何なるサブタイプのHLA抗原であっても用いることができるが、診断または選択対象のサブタイプと同じサブタイプを用いる必要がある。HLA抗原としては、例えばHLA-A\*2402等のHLA-A24抗原、HLA-A\*0201, -A\*0204, -A\*0205, -A\*0206等のHLA-A2抗原、HLA-A\*2601等のHLA-A26抗原、またHLA-A\*3101、HLA-A\*3303、HLA-A\*1101などが挙げられる。具体的には、例えばHLA-A24抗原、HLA-A2抗原またはHLA-A26抗原が挙げられる。これらHLA抗原の塩基配列およびアミノ酸配列は公知であり、例えばHLA-A24抗原については Cancer Res., 55: 4248-4252 (1995)および Genbank Accession No. M64740に開示されている。またHLA-A2抗原については Genbank Accession No. M84379に開示されている。またHLA-A26抗原については Genbank Accession No. D14350に開示されている。従ってこれら公知の塩基配列の情報に基づき、PCR法等の常法により、容易にHLA抗原の $\alpha$ 鎖をクローニングすることができる。

当該HLA抗原の $\alpha$ 鎖は、CTLの結合性や選別性を容易にするために可溶性断片であることが好ましい。さらに、ビオチン-アビジン結合により4量体化するために、当該HLA抗原 $\alpha$ 鎖のC末端はビオチン化可能な構造を有していること、すなわちビオチン結合部位が付加されていることが好ましい。

具体的には、例えばHLA-A2402（HLA-A24の1種）の場合は、正プライマー：5'-CCATGGGCAGCCATTCTATGCGCTATTTTCTACCTCCGT-3'（配列番号：19）および逆向きプライマー：5'-GGATCCTGGCTCCCATCTCAGGGTGAGGGGCTTGGGCAGACCCTC-3'（配列番号：20）を用いて、HLA-A\*2402（GenBank Acc.No. M64740）発現プラスミドを鋳型とし、

PCR反応を行うことにより、C末端タグ中の特異的リジン残基をBirA酵素でビオチニル化可能なように設計された組換え可溶性HLA-A\*2402 $\alpha$ 鎖のcDNAを得ることができる。

HLAテトラマーの成分である $\beta$ 2ミクログロブリンは、ヒト由来の $\beta$ 2ミクログロブリンが好ましい。当該ヒト由来の $\beta$ 2ミクログロブリンのcDNAは、正プライマー：5'-CATATGATCCAGCGTACCCCGAAAATTCAG-3'（配列番号：21）および逆向きプライマー：5'-GGATCCTTACATGTCTCGATCCCACTTAAC-3'（配列番号：22）を用いて、ヒト $\beta$ 2ミクログロブリン（GenBank Acc.No. AB021288）発現プラスミドを鋳型とし、PCR反応を行うことなどにより得ることができる。

HLAテトラマーの成分であるアビジンは、従来公知の如何なるアビジンであっても使用することができるが、フローサイトメトリーや蛍光顕微鏡等による検出を容易にするために、蛍光標識されていることが好ましい。蛍光色素は、公知のものを制限なく使用することができ、例えばフィコエリスリン（PE）、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ペリジニクロロフィルプロテイン（PerCP）、アロフィコシアニン（APC）、フィコエリスリン-テキサスレッド（ECDとも称する）、フィコエリスリン-シアニン5.1（PC5とも称する）などが挙げられる。

以上のHLAテトラマーの成分を含有するHLAテトラマーの作製法については、文献（Science 279: 2103-2106(1998)、Science 274: 94-96 (1996)等）により周知であるが、簡単に述べると以下のようになる。

まずタンパク質を発現可能な大腸菌や哺乳動物細胞に、HLA $\alpha$ 鎖発現ベクターおよび $\beta$ 2ミクログロブリン発現ベクターを導入し発現させる。ここでは大腸菌（例えばBL21）を用いることが好ましい。得られた単量体HLA複合体と抗原ペプチド（WT1由来の癌抗原ペプチド）とを混合し、可溶性のHLA-ペプチド複合体を形成させる。次にHLA-ペプチド複合体におけるHLA $\alpha$ 鎖のC末端部位の配列をBirA酵素によりビオチン化する。このビオチン化されたHLA-ペプチド複合体と蛍光標識されたアビジンとを4:1のモル比で混合することにより、HLAテトラマーを調製することができる。なお、前記各ステップにおいて、ゲルろ過等によるタンパク精製を行うことが好ましい。

前記工程（b）は、以上のようにして作製されたHLAテトラマーと、生体試料（被験患者より単離されたCTL前駆細胞を含む生体試料）とを接触させることにより行われる。当該接触は37℃で行うことが好ましい。また接触は、通常の生理的緩衝液、例えば血清を含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中において行うことが好ましい。

なお、HLAテトラマーの代わりに蛍光標識したストレプトアビジンを添加して同様の処理を行った陰性対照も、併せて作製しておくことが好ましい。

工程（b）の後、HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する（工程c）。当該測定は、従来公知の如何なる手法を用いて行っても良い。HLAテトラマーが蛍光標識されている場合、このHLAテトラマーに結合したCTL前駆細胞は蛍光標識されていることになるので、フローサイトメーター、蛍光顕微鏡などを用いて標識されたCTLを検出若しくは単離することができる。

HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度は、例えば、CD8陽性細胞（CD8陽性のCTL前駆細胞）、またはCD8/CD3陽性細胞（CD8/CD3陽性のCTL前駆細胞）に対する前記HLAテトラマー結合細胞の割合（頻度）を測定することにより求めることができる。

ここでCD8陽性細胞は、例えば蛍光標識したマウス抗ヒトCD8モノクローナル抗体を用いて標識・検出することができる。またCD3陽性細胞は蛍光標識したマウス抗ヒトCD3モノクローナル抗体を用いて標識・検出することができる。

ここで用いる蛍光色素は、HLAテトラマーにおいて用いられる蛍光色素と異なるものを用いる必要がある。すなわち、PE標識したHLAテトラマーを用いる場合は、FITC標識したマウス抗ヒトCD8モノクローナル抗体、およびPerCP標識したマウス抗ヒトCD3モノクローナル抗体を用いるというように、蛍光色素を区別する必要がある。

具体的な操作は、CD8陽性細胞に対するHLAテトラマー結合細胞の割合を測定する場合は、例えばPE標識HLAテトラマーと生体試料とを接触させた後、FITC標識マウス抗ヒトCD8モノクローナル抗体をさらに添加して反応させ、染色された細胞をフローサイトメーターや蛍光顕微鏡で解析する。CD8陽性細胞（CD8<sup>+</sup>）を選

択し、その中のテトラマー陽性細胞 ( $CD8^+$  tetramer $^+$ ) の割合から陰性対照のアビジン陽性細胞 ( $CD8^+$  avidin $^+$ ) の割合を差し引いた数値を、WT1抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞の割合とすることができる (以下) :

WT1抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞 (%) =

$$5 \quad \left[ \left( \frac{CD8^+ \text{ tetramer}^+ \text{ 細胞数}}{CD8^+ \text{ 細胞数}} \right) - \left( \frac{CD8^+ \text{ avidin}^+ \text{ 細胞数}}{CD8^+ \text{ 細胞数}} \right) \right] \times 100。$$

また、CD3陽性・CD8陽性細胞に対するHLAテトラマー結合細胞の割合を測定する場合は、例えばPE標識HLAテトラマーと生体試料とを接触させた後、FITC標識マウス抗ヒトCD8モノクローナル抗体及びPerCP標識マウス抗ヒトCD3抗体をさらに添加して反応させ、染色された細胞をフローサイトメーターや蛍光顕微鏡で解析する。CD3陽性およびCD8陽性細胞 ( $CD3^+$   $CD8^+$ ) を選択し、その中のテトラマー陽性細胞 ( $CD3^+$   $CD8^+$  tetramer $^+$ ) の割合から陰性対照のアビジン陽性細胞 ( $CD3^+$   $CD8^+$  avidin $^+$ ) の割合を差し引いた数値を、WT1抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞の割合とすることができる (以下) :

15 WT1抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞 (%) =

$$\left[ \left( \frac{CD3^+ \text{ } CD8^+ \text{ tetramer}^+ \text{ 細胞数}}{CD3^+ \text{ } CD8^+ \text{ 細胞数}} \right) - \left( \frac{CD3^+ \text{ } CD8^+ \text{ avidin}^+ \text{ 細胞数}}{CD3^+ \text{ } CD8^+ \text{ 細胞数}} \right) \right] \times 100。$$

以上の測定結果に基づき、WT1ワクチン応答性を判断する。具体的には、工程 (b) で得られた被験患者におけるWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量 (以下被験患者値という) を、健常人のそれ (健常人値) と比較し、両者の違いを判定することによって行うことができる。この場合、健常人から単離・調製した生体試料 (血液、リンパ液、PBMC等) が必要であるが、これらは癌に罹患していない人の生体試料を採取することによって、取得することができる。なお、ここでいう「健常人」とは、癌と診断されていない人をいう。

25 被験者値と健常人値との比較は、被験者の生体試料と健常人の生体試料を対象とした測定を並行して行うことで実施できる。並行して行わない場合は、複数 (少なくとも2つ、好ましくは3以上、より好ましくは5以上) の健常人の生体試料を用いて均一な測定条件で測定して得られた健常人値の平均値または統計的中間値を比較に用いることができる。

被験患者においてWT1ワクチン応答性が高いか否かの判断は、被験者値が健常人値と比較して1.5倍以上、好ましくは2倍以上多いことを指標として行うことができる。すなわち、被験者値が健常人値と比較して1.5倍以上、好ましくは2倍以上多ければ、WT1ワクチン応答性が高いと判断する。WT1ワクチン応答性が高いと判断された患者は、WT1ワクチンが適用可能、即ちWT1ワクチンによる治療を良好に適用できると判断される。

以上のような本発明の患者の選択方法は、ワクチン投与前の患者の診断のみならず、ワクチン治療後の診断や効能の確認にも使用することができる。

本発明はまた、以下の工程（a）、（b）および（c）：

- （a）CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、
  - （b）前記（a）の生体試料中に存在するWT1特異的なエフェクター型CTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、
  - （c）前記（b）の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチン応答性を判断する工程、
- を含む、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法、および該方法により選択された患者における癌を処置する方法を提供する。

本発明においては、WT1特異的CTL前駆細胞の機能的細分類を行った結果、健常人に比して特にエフェクター細胞の占める割合が高いことを見出した。従ってWT1特異的なエフェクター型CTL前駆細胞の量や頻度（割合）を指標として、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択を行うことができる。当該エフェクター型CTL前駆細胞を指標とした選択方法は、前述したCTL前駆細胞全体の存在頻度や量を指標とした選択方法において健常人との差が明確でなかった場合等においても、さらに詳細な解析手法として用いることができる。

具体的には以下の工程（a）、（b）、（c）および（d）：

- （a）CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、
- （b）WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマー、抗CD8抗体、抗CD45RA抗体および抗CD27抗体と、前記（a）の生体試料とを接触させる工程、
- （c）CD8陽性またはCD8/CD3陽性であり、かつHLAテトラマー結合



陽性のCTL前駆細胞中での、CD45RA陽性かつCD27陰性のエフェクター型CTL前駆細胞の割合を測定する工程、

(d) 前記(c)の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチン応答性を判断する工程、

5      を含む選択方法、および該方法により選択された患者における癌を処置する方法が例示される。

ここで「エフェクター細胞」とはCD45RA陽性かつCD27陰性であるCTL前駆細胞を指す。当該エフェクター細胞の頻度は、CTL前駆細胞中でのCD45RA陽性かつCD27陰性細胞の割合を測定することにより、求めることができる。具体的には、被験サンプルをHLAテトラマー、抗CD8抗体、抗CD45RA抗体および抗CD27抗体と接触させ、CD8陽性またはCD8/CD3陽性であり、かつHLAテトラマー陽性のCTL前駆細胞(WT1特異的CTL前駆細胞)中でのCD45RA陽性かつCD27陰性細胞の割合を測定することにより、求めることができる。

15      ここでCD45RA陽性細胞は、例えば蛍光標識したマウス抗ヒトCD45RAモノクローナル抗体を用いて標識・検出することができる。またCD27陽性細胞は、例えば蛍光標識したマウス抗ヒトCD27モノクローナル抗体を用いて標識・検出することができる。ここで用いる蛍光色素は、HLAテトラマー、抗CD8抗体、あるいは抗CD3抗体において用いられている蛍光色素とは異なるものを用いる必要がある。具体的には、例えばPE標識したHLAテトラマー、FITC標識した抗CD8モノクローナル抗体、Per標識した抗CD3モノクローナル抗体を用いる場合は、ECD標識マウス抗ヒトCD45RAモノクローナル抗体およびPC5標識マウス抗ヒトCD27モノクローナル抗体を用いるというように、蛍光色素を区別する必要がある。これら標識抗体等は、Beckman Coulter等から購入することができる。

5      当該前駆細胞の具体的な測定法等については、前述のCTL前駆細胞の存在頻度や量を指標とした選択方法と同様にして行うことができる。

以上のようなWT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法はまた、癌の診断にも適応することができる。すなわち本発明においては、造血器悪性腫瘍や肺癌患者等の患者において、健常人に比してWT1特異的CTL前駆細胞の頻度が高いことを見

出した。従ってWT1特異的CTL前駆細胞の頻度、またはWT1特異的なエフェクター型CTL前駆細胞の頻度を指標として、癌の診断を行うことができる。ここで診断可能な癌としては、白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌が挙げられる。好ましくは

5 白血病、骨髄異形成症候群および肺癌が挙げられる。

本発明はまた、以下の工程（a）－（d）：

（a）CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

（b）前記（a）の生体試料に複数のWT1ワクチンの標的分子をそれぞれ適用し、

10

（c）前記（b）の生体試料中それぞれに存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定し、それぞれ比較する工程、

（d）前記（c）の測定結果に基づいて、その患者に有効なWT1ワクチンの標的分子を同定する工程、

15 を含む、患者固有のWT1ワクチン標的分子の同定方法を提供する。

本発明においては、ワクチン投与前の癌患者において、従来にない高い頻度でWT1特異的なCTL前駆細胞が存在していることを見出した。従ってWT1特異的なCTL前駆細胞の量や頻度を指標として、患者固有のWT1ワクチンの標的分子（治療用の標的分子）の同定を行うことができる。

20 すなわち前記標的分子の同定方法は、WT1ワクチン応答性が高いと判断された患者に対して治療上最適の標的分子（抗原ペプチド）を同定するために、有効に用いられる。

具体的には、前記WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法と同様に、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペンタマー法、エリスポット法、リアルタイムRT-PCR法または限界希釈法等により、WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定することにより行われる。好ましくはHLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペンタマー法が用いられる。以下HLAテトラマー法を例にとり具体的に説明する。

25

HLAテトラマー法は、以下の工程（a）、（b）、（c）および（d）：

- (a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、
- (b) WT1由来の複数の癌抗原ペプチドを含有する複数のHLAテトラマーと、前記(a)の生体試料とをそれぞれ接触させる工程、
- (c) HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量をそれぞれ測定し、比較する工程、
- (d) 前記(c)の測定結果に基づいて、その患者に有効なWT1由来の癌抗原ペプチドを同定する工程、
- を含んで行われる。

具体的にはまず、候補となるWT1由来癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーを複数作製する。そして、それぞれのHLAテトラマーと被験患者より単離した生体試料とを接触させ、HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する。各HLAテトラマーについての測定結果を比較し、最も高い値を示したHLAテトラマーが含有する癌抗原ペプチド（すなわち、最もCTLに認識されやすい癌抗原ペプチド）を、その患者に対するWT1ワクチン治療のための標的分子、即ち患者固有の標的分子として同定する。

ここで用いる癌抗原ペプチドは、WT1に由来する癌抗原ペプチドであれば如何なるものであっても良いが、例えば配列番号：2～18に記載の癌抗原ペプチドが挙げられる。好ましくは配列番号：2～5のいずれかに記載の癌抗原ペプチドが挙げられる。

なお、各工程の具体的な手法や成分の調製法などについては、前述のWT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法の項を参照されたい。

本発明のWT1ワクチン標的分子の同定方法によれば、患者固有の癌を処置できる標的分子が同定される。よって、本発明は別の態様として、本発明の同定方法により同定された患者固有のWT1ワクチン標的分子を含有する、患者固有の癌を処置するための当該患者用の医薬組成物、および該同定方法により同定された標的分子を投与する、患者固有の癌を処置する方法を提供する。本発明の医薬組成物には癌ワクチンが含まれ、当業者に周知のアジュバント等を含有することができる。

本発明はまた、WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAモノマー、HLAダイマ

一、HLAテトラマーまたはHLAペンタマーを成分とする、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択のための臨床検査薬を提供する。以下HLAテトラマーを例にとり本発明の臨床検査薬につき説明する。

5 本発明の臨床検査薬の成分となるHLAテトラマーは、前述のようにHLA抗原の $\alpha$ 鎖と $\beta$ 2ミクロglobulinをWT1由来の癌抗原ペプチドと会合させた複合体（HLAモノマー）をビオチン化し、アビジンに結合させることにより4量体化したものを指す（Science 279: 2103-2106(1998)、Science 274: 94-96 (1996)）。

10 ここで用いる癌抗原ペプチドは、WT1に由来する癌抗原ペプチドであれば如何なるものであっても良いが、例えば配列番号：2～18に記載の癌抗原ペプチドが挙げられる。好ましくは配列番号：2～5のいずれかに記載の癌抗原ペプチドが挙げられる。

当該HLAテトラマーの各成分の調製法やHLAテトラマーの作製法については、前述のWT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法の項に記載したとおりである。

15 本発明の臨床検査薬は、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択のためのキットの1成分とすることができる。当該キットは、前記本発明の臨床検査薬のみからなるキットであっても、また本発明の臨床検査薬と他の成分とを含むキットであっても良い。当該キット中の他の成分としては、蛍光標識ストレプトアビジン、  
20 蛍光標識マウス抗ヒトCD8モノクローナル抗体、蛍光標識マウス抗ヒトCD3モノクローナル抗体などが挙げられる。またエフェクター細胞を検出する場合は、蛍光標識マウス抗ヒトCD45RAモノクローナル抗体、蛍光標識マウス抗ヒトCD27モノクローナル抗体を含むこともできる。

25 ここで蛍光色素としては、フィコエリスリン（PE）、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ペリジニクロロフィルプロテイン（PerCP）、アロフィコシアニン（APC）、フィコエリスリン-テキサスレッド（ECDとも称する）、フィコエリスリン-シアニン5.1（PC5とも称する）などが挙げられる。

本発明の臨床検査薬およびキットは、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択に使用できる他、WT1ワクチンの標的分子（治療用の標的分子）の選択にも使用することができる。また同様の成分にて癌の診断薬として使用することもできる。

本発明はまた、以下の工程（a）－（c）：

(a) CTLを含む生体試料をWT1ワクチン投与後の患者より単離する工程、

(b) 前記 (a) の生体試料中に存在するWT1特異的なCTLの存在頻度または量を測定する工程、

(c) 前記 (b) の測定結果をWT1ワクチン投与前のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチンによる治療の適合性を判断する工程、  
5 を含む、該患者における該WT1ワクチンの適合性を判定する方法、および該判定方法により適合性ありと判定された患者を、WT1またはWT1由来の癌抗原ペプチドにより処置する、該患者における癌を処置する方法を提供する。

後述の実施例に示したように、WT1由来の癌抗原ペプチド (WT1ワクチン) による治療を実施中の患者におけるWT1特異的CTLの頻度を測定したところ、ペプチド投与前に対する投与後のCTL頻度の増加と治療効果とが相関していることを見出した。すなわち、WT1ペプチド投与後のWT1特異的CTLの頻度が、ペプチド投与前のCTL頻度に比して1.5倍以上増加した場合を「免疫反応陽性」と定義し、この免疫反応性と治療効果との関連性について評価した。その結果、免疫反応性と治療効果の間には正の相関関係が認められた。この結果から、前記免疫反応性 (CTLの頻度や量の増加) を指標として、対象患者においてWT1ワクチンによる治療が適しているかどうかを判断できることが明らかとなった。

すなわち本発明の判定方法は、WT1ワクチン投与を実施中の患者において、ペプチド投与による治療を続行するか否かといった治療の適合性を判定するために、  
20 有効に用いられる。

本発明の判定方法における工程 (a) および (b) の具体的な操作については、前記「WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法」の項に記載した通りであり、具体的には、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペンタマー法、エリスポット法、リアルタイムRT-PCR法または限界希釈法等により、WT1特異的なCTLの存在頻度または量を測定することにより行われる。

工程 (c) におけるWT1ワクチンによる治療が適しているか否かの判断は、WT1ワクチン投与後の患者におけるWT1特異的なCTLの存在頻度または量 (以下、投与後値という) を、WT1ワクチン投与前のそれ (以下、投与前値という) と比較し、両者の違いを判定することによって行うことができる。

ここで「ワクチン投与後」とは、WT1ワクチンを1回以上投与した後のどのタイミングであっても良いが、2週間間隔でのペプチド投与スケジュールの場合、1回目～5回目のWT1ワクチン投与後、より好ましくは1回目～3回目のペプチド投与後のタイミングが挙げられる。

5 WT1 ワクチンによる治療が適しているか否かの判断は、WT1ワクチン投与後値が投与前値に比して1.5倍以上高いことを指標として行うことができる。すなわち、投与後値が投与前値と比較して1.5倍以上高ければ、WT1ワクチンによる治療が適していると判断する。この知見に基づき、本発明は、患者における該WT1 ワクチンの適合性を判定する本発明方法により適合性ありと判定された患者を、WT  
10 1またはWT1由来の癌抗原ペプチドにより処置する、該患者における癌を処置する方法をも提供する。

前記CTLの測定法のうち、手法の容易さおよび精度の観点から最も好ましいのはHLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペンタマー法である。以下HLAテトラマー法を例にとり説明する。

15 HLAテトラマー法は、以下の工程(a)、(b)、(c)および(d)：  
(a) CTLを含む生体試料をWT1 ワクチン投与後の患者より単離する工程、  
(b) WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーと、前記(a)の生体試料とを接触させる工程、  
(c) HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTLの存在頻度または量を測定する  
20 工程、  
(d) 前記(c)の測定結果をWT1 ワクチン投与前のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1 ワクチンによる治療の適合性を判断する工程、  
を含んで行われる。

ここでHLAテトラマーの成分とされるHLA抗原としては、HLA-A24抗原または  
25 HLA-A2抗原が挙げられる。またHLAテトラマーの成分とされる癌抗原ペプチドとしては、例えばCys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)またはArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5)が挙げられる。これら配列番号2～5に記載のペプチドは全てHLA-

A24結合性のペプチドであるため、前記本発明の判定法において用いられるHLAテトラマーとしては、配列番号：2～5に記載のいずれかのペプチドとHLA-A24抗原とを含有するHLAテトラマーが挙げられる。さらに配列番号：2および4に記載のペプチドはHLA-A2抗原に結合性のペプチドでもあるため、配列番号：2または4記載のペプチドとHLA-A2抗原とを含有するHLAテトラマーも挙げることができる。

前記本発明の判定方法および処置方法においては、治療に用いたペプチドと同じペプチド、若しくは治療に用いたペプチドにより誘導されるCTLが交差反応性を示すペプチド、を含有するHLAテトラマーを用いることが好ましい。例えば患者の治療において配列番号：3に記載のペプチドを用いた場合は、配列番号：2または3に記載のペプチドとHLA-A24抗原とを含有するHLAテトラマーが有効に用いられる。

本発明のHLAテトラマーを用いた判定方法および処置方法における工程（a）～（c）の具体的な操作については、前記「WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法」の項に記載した通りである。また工程（d）については前述のように投与前値と投与後値との比較に基づいて判断される。

以下、本発明の定方法および処置方法の具体例を示す。

まず、WT1由来の癌抗原ペプチド投与前の癌患者から血液を採取し、PBMCを分離する（投与前試料）。次に、ペプチド投与による治療を実施した患者の血液を採取してPBMCを分離する（投与後試料）。これら投与前試料、投与後試料に対してHLAテトラマーを添加し、前記「WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法」の項および実施例3に記載の解析手法を用いてペプチド特異的CTLの頻度を測定・算出する。投与前試料におけるCTL頻度に比して、投与後試料におけるCTL頻度が1.5倍以上高い場合に、WT1ワクチンによる治療が適している（WT1ワクチンによる治療効果があがると期待される）と判断する。

本発明はまた、WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペンタマーを成分とする、WT1ワクチンの適合性の判定のための臨床検査薬、および当該臨床検査薬を含有するキットを提供する。当該臨床検査薬およびキットの成分については前記「WT1ワクチン応答性が高い

患者の選択のための臨床検査薬」の項に記述した通りである。

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

## 5 実施例 1

### 末梢血単核球の調製

10 HLA-A\*2402陽性の癌患者とHLA-A\*2402陽性の健常人からインフォームドコンセントを取得した後、採血をおこなった。造血器悪性腫瘍患者は18名で、その内訳は急性骨髄性白血病（AML）患者11名、急性リンパ性白血病（ALL）患者2名、慢性骨髄性白血病（CML）患者1名、骨髄異形成症候群（MDS）患者4名であった。肺癌患者は7名、HLA-A\*2402陽性の健常人は10名であった。

造血器悪性腫瘍患者は、診断時または治療経過において、骨髄および末梢血検体についてWT1遺伝子の有意な高発現が1回以上確認されている。また肺癌患者は、生体検体または摘出標本でWT1遺伝子の高発現が確認されている。

15 採取した血液からFicoll-Hypaqueの密度勾配遠心法により末梢血単核球（PBMC）を分離し、液体窒素中で凍結保存した。

## 実施例 2

### HLAテトラマーの調製

20 WT1タンパク質の235番目から243番目の9アミノ酸から成るペプチド（配列番号：2）を用い、文献（Int. J. Cancer: 100, 565-570, 2002）に記載の方法により蛍光色素Phycoerythrin（PE）で標識したHLA-A\*2402のテトラマーを作製した。

まず、組換え可溶性HLA-A\*2402のcDNAを増幅するため、下記正プライマー：5'-CCATGGGCAGCCATTCTATGCGCTATTTTCTACCTCCGT-3'（配列番号：19）および逆  
25 向きプライマー：5'-GGATCCTGGCTCCCATCTCAGGGTGAGGGGCTTGGGCAGACCCTC-3'（配列番号：20）を用いて、HLA-A\*2402（GenBank Acc. No. M64740）発現プラスミドを鋳型とし、PCRを行った。逆向きプライマーは、C末端でフレームが一致するようにBirA認識配列をコードしている。増幅した断片を制限酵素NcoIおよびBamHIで切断し、pET11dベクター（Novagen社）にクローニングした。



次に、組換えヒト $\beta$ 2ミクログロブリンのcDNAを増幅するため、下記正プライマー：5'-CATATGATCCAGCGTACCCCGAAAATTCAG-3'（配列番号：21）および逆相プライマー：5'-GGATCCTTACATGTCTCGATCCCACTTAAC-3'（配列番号：22）を用いて、ヒト $\beta$ 2ミクログロブリン（GenBank Acc.No. AB021288）発現プラスミドを鋳型とし、PCRを行った。増幅した断片を制限酵素NdeIおよびBamHIで切断し、pET11aベクター（Novagen社）にクローニングした。

前記2種類のベクターを大腸菌BL21で発現させ、インクルージョンボディーの不溶画分として回収した。それぞれのインクルージョンボディーは8M尿素溶液で溶解後、リフォールディングバッファーで希釈し、更にペプチド（配列番号：2）を添加して可溶性のHLA-ペプチド複合体を形成させた。次にHLA-ペプチド複合体のC末端部位の配列をBirA酵素によりビオチン化し、ゲルろ過法でビオチン化されたHLA-ペプチド複合体を精製した。ビオチン化されたHLA-ペプチド複合体とPE標識されたアビジン（Molecular Probe社）を4：1のモル比で混合して、HLAテトラマーを調製した。

### 実施例3

#### WT1特異的CTL前駆細胞のHLAテトラマーによる解析

実施例1の凍結したPBMCを解凍した直後に0.5%ウシ胎児血清（FCS）を含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に $1 \times 10^6$ 個/mlで再浮遊し、実施例2で調製したテトラマー溶液（500  $\mu$ g/ $\mu$ l）2  $\mu$ lを加え、37°Cで30分間インキュベートした。陰性対照として、テトラマーの代わりにPE標識したストレプトアビジン（Becton Dickinson社）を添加し、同様に処理をした検体も用意した。その後氷中で急冷し、FITC標識マウス抗ヒトCD8モノクローナル抗体（BD Pharmingen社）及びPerCP標識マウス抗ヒトCD3抗体（BD Pharmingen社）を各15  $\mu$ l添加して、4°Cで30分間インキュベートした。染色した細胞は、0.5%FCSを含むPBSで2回遠心洗浄した後、フローサイトメーターFACSsort（Becton Dickinson社）で解析した。CD3陽性及びCD8陽性の細胞（CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>）を選択し、その選択した細胞中のテトラマー陽性細胞（CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>tetramer<sup>+</sup>）の割合（頻度）から陰性対照のPE標識ストレプトアビジン陽性細胞（CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>avidin<sup>+</sup>）の割合を差し引いた数値をWT1抗原ペプチド特異的

CTL前駆細胞の割合とした：

WT1抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞（％）＝

$$\left[ \frac{(\text{CD3}^+ \text{CD8}^+ \text{tetramer}^+ \text{細胞数} / \text{CD3}^+ \text{CD8}^+ \text{細胞数}) - (\text{CD3}^+ \text{CD8}^+ \text{avidin}^+ \text{細胞数} / \text{CD3}^+ \text{CD8}^+ \text{細胞数})}{1} \right] \times 100$$

- 5 癌患者と健常人PBMCを解析した結果を表2に示す。また、この結果を疾患別にプロットしたものを図1に示す。この結果から、CD3/CD8陽性細胞中のWT1抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞の割合は、健常人では0.47～1.30％で平均が0.82％であったが、造血器悪性腫瘍患者では、1.04～29.45％で平均が5.24％、肺癌患者では0.33～5.97％で平均が2.44％であり、統計解析により健常人に比べて造血器
- 10 悪性腫瘍患者及び肺癌患者では有意に増加していることが明らかとなった（ $p < 0.05$ ）。

表 2

検体名	CTLプリカーサー頻度（％）
急性骨髄性白血病（AML）患者1	8.26
急性骨髄性白血病（AML）患者2	8.01
急性骨髄性白血病（AML）患者3	5.12
急性骨髄性白血病（AML）患者4	3.84
急性骨髄性白血病（AML）患者5	4.51
急性骨髄性白血病（AML）患者6	3.27
急性骨髄性白血病（AML）患者7	2.68
急性骨髄性白血病（AML）患者8	2.60
急性骨髄性白血病（AML）患者9	1.77
急性骨髄性白血病（AML）患者10	1.04
急性骨髄性白血病（AML）患者11	1.49
急性リンパ性白血病（ALL）患者1	7.32
急性リンパ性白血病（ALL）患者2	1.78
慢性骨髄性白血病（CML）患者	2.46
骨髄異形成症候群（MDS）患者1	29.45
骨髄異形成症候群（MDS）患者2	2.99
骨髄異形成症候群（MDS）患者3	2.81
骨髄異形成症候群（MDS）患者4	2.08
肺癌患者1	5.97
肺癌患者2	3.83
肺癌患者3	2.63
肺癌患者4	1.89
肺癌患者5	1.69
肺癌患者6	0.72

肺癌患者7	0.33
健常人1	1.30
健常人2	1.05
健常人3	1.08
健常人4	0.85
健常人5	0.81
健常人6	0.79
健常人7	0.61
健常人8	0.64
健常人9	0.57
健常人10	0.47

#### 実施例 4

##### ペプチド投与におけるWT1特異的CTLの頻度解析

以下の試験は、大阪大学医学部の倫理委員会の承認を受け、癌患者のインフォームドコンセントを得た上で実施された。

WT1の235番目から243番目までの配列のペプチド（配列番号：2）または、このペプチドのN末端から2番目のメチオニンをチロシンに置換した改変ペプチド（配列番号：3）を癌患者に1回当たり、0.3mg、1mgまたは3mg投与した。投与するペプチドはMontanide ISA51 (SEPPIC社)を用いてエマルジョン化して、1回若しくは2週間間隔で複数回皮内投与した。患者としては、HLA-A\*2402陽性およびWT1陽性である肺癌、乳癌、または白血病の患者を対象とした。

投与ペプチドに対する免疫反応は、実施例3と同様のHLAテトラマー法でペプチド特異的CTL頻度を測定して評価した。ペプチド投与後のいずれかの段階でのペプチド特異的CTL頻度がペプチド投与前の1.5倍以上増加した場合を「免疫反応陽性」と定義した。また、ペプチド投与後に腫瘍マーカー値の低下、腫瘍細胞や腫瘍容積の減少が認められた場合を「治療効果有り」と判定した。ペプチド投与による免疫反応と治療効果がともに評価可能であった19名の癌患者について、免疫反応と治療効果の相関をカイ2乗検定により評価した。その結果、治療効果が認められた11名の患者の内、8名（73%）で免疫反応陽性であったが、治療効果の認められなかった8名の内、免疫反応陽性であったのはわずか2名（25%）のみであり、治療効果と免疫反応には有意な正の相関（ $P=0.0397$ ）が認められた。この結果より、投与ペプチド特異的なCTLの誘導は、治療効果にとって重要なフ

ァクターであることが示された。またペプチド投与による治療が順調に進んでいることの確認や、ペプチド投与による治療を続行するか否かの判断において、前記免疫反応性が1つの指標となることが示された。

## 5 実施例 5

### WT1特異的CTLの機能解析

HLAテトラマー染色陽性およびCD8陽性の抗原ペプチド特異的CTLは、更に抗CD45RA抗体と抗CD27抗体で染色することにより、機能的に細分類できることが報告されている (J. Exp. Med., 186, p1407, 1997)。CD45RA陽性かつCD27陽性はナイーブ型、CD45RA陰性かつCD27陽性、およびCD45RA陰性かつCD27陰性はメモリー型、そしてCD45RA陽性かつCD27陰性はエフェクター型に分類される。エフェクター型が、強いCTL活性を示す細胞集団である。

実施例 4 の臨床研究に参加したHLA-A\*2402陽性の癌患者24名（血液癌14名、固形癌10名）のペプチド投与前のPBMC及びインフォームドコンセントを取得して採取したHLA-A\*2402陽性の健常人のPBMCを用いて、HLAテトラマー染色陽性およびCD8陽性のWT1ペプチド特異的CTL前駆細胞の機能分析を行った。フローサイトメーター解析用に実施例 3 と同様な方法で細胞をHLAテトラマー、抗CD8抗体、抗CD45RA抗体、抗CD27 抗体で染色した。HLAテトラマー陽性かつCD8陽性の細胞集団における、CD45RA陽性/CD27陽性のナイーブ型、CD45RA陰性のメモリー型、CD45RA陽性/CD27陰性のエフェクター型の割合（％）を、それぞれ算出した。ナイーブ型、メモリー型、エフェクター型の比率はそれぞれ、癌患者で23.7%、45.5%、30.8%であった。一方健常人ではそれぞれ、35.9%、53.8%、8.9%であった。癌患者と健常人で比較すると、エフェクター型については、癌患者で有意に比率が高かったが ( $p < 0.05$ )、ナイーブ型、メモリー型については有意な差は認められなかった。実施例 3 で癌患者ではWT1特異的CTL前駆細胞が増加していることを示したが、それらの内で癌患者ではエフェクター型の機能を持ったCTLの割合が増加していることが明らかとなった。この結果より、エフェクター型のCTL前駆細胞の存在頻度を1つの指標として癌患者を診断できることが示された。

### 産業上の利用可能性

本発明により、WT 1 特異的 C T L 前駆細胞の頻度を指標とした、WT 1 ワクチン応答性が高い患者の選択方法およびそれを利用する癌の処置方法や、その選択のための臨床検査薬などが提供される。本発明の選択方法により、より WT 1 ワクチン療法による効果の期待される患者を選択することができ、癌に対する適切な処置を施すことが可能となる。

## 請 求 の 範 囲

1. 以下の工程 (a)、(b) および (c) :

(a) C T L 前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

5 (b) 前記 (a) の生体試料中に存在する W T 1 特異的な C T L 前駆細胞の存在  
頻度または量を測定する工程、

(c) 前記 (b) の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、W  
T 1 ワクチン応答性を判断する工程、

を含む、W T 1 ワクチン応答性が高い患者の選択方法。

10 2. W T 1 特異的な C T L 前駆細胞の存在頻度または量を、H L A モノマー  
法、H L A ダイマー法、H L A テトラマー法、H L A ペンタマー法、エリスポッ  
ト法、リアルタイム R T - P C R 法および限界希釈法のいずれかの方法により測  
定する、請求項 1 記載の選択方法。

3. H L A テトラマー法により測定する、請求項 2 記載の選択方法。

15 4. 以下の工程 (a)、(b)、(c) および (d) :

(a) C T L 前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

(b) W T 1 由来の癌抗原ペプチドを含有する H L A テトラマーと、前記 (a)  
の生体試料とを接触させる工程、

20 (c) H L A テトラマーに結合した W T 1 特異的な C T L 前駆細胞の存在頻度ま  
たは量を測定する工程、

(d) 前記 (c) の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、W  
T 1 ワクチン応答性を判断する工程、

を含む、請求項 3 記載の選択方法。

25 5. 請求項 4 に記載の工程 (c) が、C D 8 陽性または C D 8 / C D 3 陽性  
の C T L 前駆細胞中での H L A テトラマー結合細胞の割合を測定することにより  
行われる、請求項 4 記載の選択方法。

6. H L A テトラマーの構成成分である H L A 抗原が H L A - A 2 4 抗原ま  
たは H L A - A 2 抗原である、請求項 4 または 5 記載の選択方法。

7. W T 1 由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn

Leu (配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)および Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5) より選択される、請求項4～6いずれか記載の選択方法。

5        8.    フローサイトメトリーを用いて行われる請求項1～7いずれか記載の選択方法。

9.    WT1 特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量が、健常人の値と比較して1.5倍以上高いことを指標としてWT1ワクチン応答性を判断する、請求項1～8いずれか記載の選択方法。

10       10.   CTL前駆細胞がエフェクター型CTL前駆細胞である、請求項1記載の選択方法。

15       11.   WT1 特異的なエフェクター型CTL前駆細胞の存在頻度または量の測定に、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペンタマー法、エリスポット法、リアルタイムRT-PCR法および限界希釈法のいずれかの方法を利用する、請求項10記載の選択方法。

12.   HLAテトラマー法を利用する、請求項11記載の選択方法。

13.   以下の工程 (a)、(b)、(c) および (d) :

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

20       (b) WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマー、抗CD8抗体、抗CD45RA抗体および抗CD27抗体と、前記(a)の生体試料とを接触させる工程、

(c) CD8陽性またはCD8/CD3陽性であり、かつHLAテトラマー結合陽性のCTL前駆細胞中での、CD45RA陽性かつCD27陰性のエフェクター型CTL前駆細胞の割合を測定する工程、

25       (d) 前記(c)の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチン応答性を判断する工程、を含む、請求項12記載の選択方法。

14.   HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、請求項13記載の選択方法。

15. WT 1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)および Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5)より選択される、請求項13または14記載の選択方法。

16. フローサイトメトリーを用いて行われる請求項10～15いずれか記載の選択方法。

17. 以下の工程 (a)、(b) および (c) :

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験者より単離する工程、

(b) 前記 (a) の生体試料中に存在するWT 1 特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、

(c) 前記 (b) の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、癌の罹患を判断する工程、を含む、癌の診断方法。

18. WT 1 特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペンタマー法、エリスポット法、リアルタイムRT-PCR法および限界希釈法のいずれかの方法により測定する、請求項17記載の診断方法。

19. HLAテトラマー法により測定する、請求項18記載の診断方法。

20. 以下の工程 (a)、(b)、(c) および (d) :

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験者より単離する工程、

(b) WT 1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーと、前記 (a) の生体試料とを接触させる工程、

(c) HLAテトラマーに結合したWT 1 特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、

(d) 前記 (c) の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、癌の罹患を判断する工程、を含む、請求項19記載の診断方法。

21. 請求項20に記載の工程 (c) が、CD8陽性またはCD8/CD3



陽性のCTL前駆細胞中でのHLAテトラマー結合細胞の割合を測定することにより行われる、請求項20記載の診断方法。

22. HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、請求項20または21記載の診断方法。

5 23. WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)および Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5)より選択される、請求項20～22いずれか記載の診断方法。

10 24. フローサイトメトリーを用いて行われる請求項17～23いずれか記載の診断方法。

25. WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量が、健常人の値と比較して1.5倍以上高いことを指標として癌の罹患を判断する、請求項17～24いずれか記載の診断方法。

15 26. CTL前駆細胞がエフェクター型CTL前駆細胞である、請求項17記載の診断方法。

20 27. WT1特異的なエフェクター型CTL前駆細胞の存在頻度または量の測定に、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペンタマー法、エリスポット法、リアルタイムRT-PCR法および限界希釈法のいずれかの方法を利用する、請求項26記載の診断方法。

28. HLAテトラマー法を利用する、請求項27記載の診断方法。

29. 以下の工程(a)、(b)、(c)および(d)：

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験者より単離する工程、

25 (b) WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマー、抗CD8抗体、抗CD45RA抗体および抗CD27抗体と、前記(a)の生体試料とを接触させる工程、

(c) CD8陽性またはCD8/CD3陽性であり、かつHLAテトラマー結合陽性のCTL前駆細胞中での、CD45RA陽性かつCD27陰性のエフェクター型CTL前駆細胞の割合を測定する工程、

(d) 前記(c)の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、癌の罹患を判断する工程、  
を含む、請求項28記載の診断方法。

30. HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原  
またはHLA-A2抗原である、請求項29記載の診断方法。

31. WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn  
Leu (配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、  
Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)および Arg Tyr Pro Ser  
Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5) より選択される、請求項29または30  
記載の診断方法。

32. フローサイトメトリーを用いて行われる請求項26～31いずれか記載の診断方法。

33. 以下の工程(a)－(d)：

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

(b) 前記(a)の生体試料に複数のWT1ワクチンの標的分子をそれぞれ適用し、

(c) 前記(b)の生体試料中それぞれに存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定し、それぞれ比較する工程、

(d) 前記(c)の測定結果に基づいて、その患者に有効なWT1ワクチンの標的分子を同定する工程、

を含む、患者固有のWT1ワクチン標的分子の同定方法。

34. WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペンタマー法、エリスポット法、リアルタイムRTPCR法および限界希釈法のいずれかの方法により測定する、請求項33記載の同定方法。

35. HLAテトラマー法により測定する、請求項34記載の同定方法。

36. 以下の工程(a)－(d)：

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

(b) WT1由来の複数の癌抗原ペプチドを含有する複数のHLAテトラマーと、

前記（a）の生体試料とをそれぞれ接触させる工程、

（c）HLAテトラマーに結合したWT 1 特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量をそれぞれ測定し、比較する工程、

（d）前記（c）の測定結果に基づいて、その患者に有効なWT 1 由来の癌抗原ペプチドを同定する工程、

を含む、請求項 3 5 記載の同定方法。

37. 請求項 3 6 に記載の工程（c）が、CD 8 陽性またはCD 8 /CD 3 陽性のCTL前駆細胞中でのHLAテトラマー結合細胞の割合を測定することにより行われる、請求項 3 6 記載の同定方法。

38. HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A 2 4 抗原またはHLA-A 2 抗原である、請求項 3 6 または 3 7 記載の同定方法。

39. WT 1 由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：2）、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：3）、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu（配列番号：4）および Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe（配列番号：5）より選択される、請求項 3 6 ～ 3 8 いずれか記載の同定方法。

40. フローサイトメトリーにより行われる請求項 3 3 ～ 3 9 いずれか記載の同定方法。

41. WT 1 由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペンタマーを成分とする、WT 1 ワクチン応答性が高い患者の選択のための臨床検査薬。

42. HLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペンタマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A 2 4 抗原またはHLA-A 2 抗原である、請求項 4 1 記載の臨床検査薬。

43. WT 1 由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：2）、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：3）、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu（配列番号：4）および Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe（配列番号：5）より選択される、請求項 4 1 または 4 2 に記載の臨床検査薬。

4 4. 請求項 4 1～4 3いずれか記載の臨床検査薬を含有するキット。

4 5. 請求項 3 3～4 0いずれか記載の患者固有のWT 1 ワクチン標的分子の同定方法により同定された標的分子を含有する、患者固有の癌を処置するための当該患者用の医薬組成物。

5 4 6. WT 1 由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペンタマーを成分とする、癌の診断薬。

4 7. HLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペンタマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A 2 4 抗原またはHLA-A 2 抗原である、請求項 4 6 記載の診断薬。

10 4 8. WT 1 由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)および Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5) より選択される、請求項 4 6 または 4 7 に記載の診断薬。

15 4 9. 請求項 4 6～4 8いずれか記載の診断薬を含有するキット。

5 0. 以下の工程 (a)、(b) および (c)：

(a) CTLを含む生体試料をWT 1 ワクチン投与後の患者より単離する工程、  
(b) 前記 (a) の生体試料中に存在するWT 1 特異的なCTLの存在頻度または量を測定する工程、

20 (c) 前記 (b) の測定結果をWT 1 ワクチン投与前のそれと比較して高いか否かを判定し、WT 1 ワクチンによる治療の適合性を判断する工程、を含む、該患者における該WT 1 ワクチンの適合性を判定する方法。

5 1. WT 1 特異的なCTLの存在頻度または量を、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペンタマー法、エリスポット法、リアルタイムRT-PCR法および限界希釈法のいずれかの方法により測定する、  
25 請求項 5 0 記載の判定方法。

5 2. HLAテトラマー法により測定する、請求項 5 1 記載の判定方法。

5 3. 以下の工程 (a)、(b)、(c) および (d)：

(a) CTLを含む生体試料をWT 1 ワクチン投与後の患者より単離する工程、

(b) WT 1 由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーと、前記 (a) の生体試料とを接触させる工程、

(c) HLAテトラマーに結合したWT 1 特異的なCTLの存在頻度または量を測定する工程、

5 (d) 前記 (c) の測定結果をWT 1 ワクチン投与前のそれと比較して高いか否かを判定し、WT 1 ワクチンによる治療の適合性を判断する工程、を含む、請求項 5 2 記載の判定方法。

10 5 4. 請求項 5 3 に記載の工程 (c) が、CD 8 陽性またはCD 8 /CD 3 陽性のCTL中でのHLAテトラマー結合細胞の割合を測定することにより行われる、請求項 5 3 記載の判定方法。

5 5. HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A 2 4 抗原またはHLA-A 2 抗原である、請求項 5 3 または 5 4 記載の判定方法。

15 5 6. WT 1 由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号 : 2) 、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号 : 3) 、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号 : 4) および Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号 : 5) より選択される、請求項 5 3 ~ 5 5 いずれか記載の判定方法。

5 7. フローサイトメトリーを用いて行われる請求項 5 0 ~ 5 6 いずれか記載の判定方法。

20 5 8. WT 1 特異的なCTLの存在頻度または量が、WT 1 ワクチン投与前の値と比較して1. 5 倍以上高いことを指標としてWT 1 ワクチンによる治療が適しているか否かを判断する、請求項 5 0 ~ 5 7 いずれか記載の判定方法。

25 5 9. WT 1 由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペンタマーを成分とする、WT 1 ワクチンの適合性の判定のための臨床検査薬。

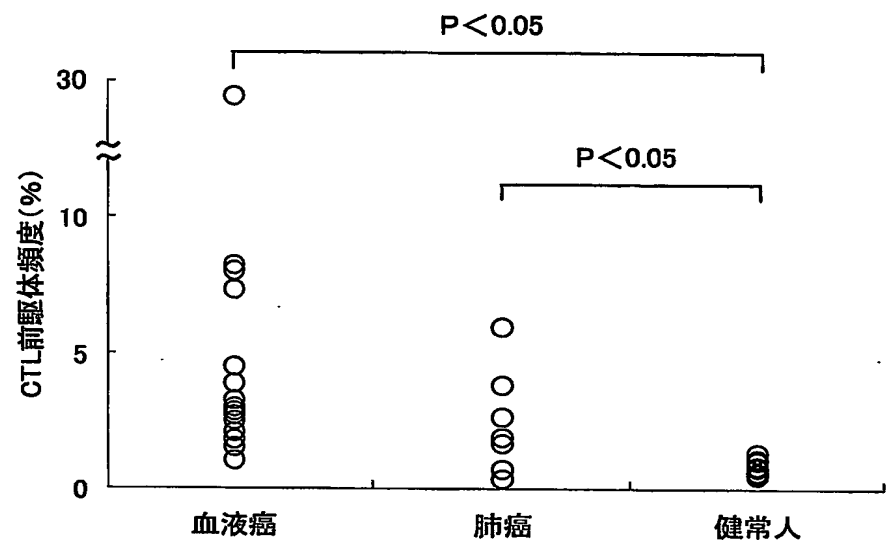
6 0. HLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペンタマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A 2 4 抗原またはHLA-A 2 抗原である、請求項 5 9 記載の臨床検査薬。

6 1. WT 1 由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn

Leu (配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)および Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5) より選択される、請求項59または60に記載の臨床検査薬。

- 5        62.    請求項59～61いずれか記載の臨床検査薬を含有するキット。

図 1



1/11

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Haruo, Sugiyama

<120> Method for selecting a subject which is applicable to  
WT1 vaccine

&lt;130&gt; 664590

&lt;150&gt; JP 2003-184436

&lt;151&gt; 2003-06-27

&lt;150&gt; JP 2004-070497

&lt;151&gt; 2004-03-12

&lt;160&gt; 22

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 449

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro  
1 5 10 15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala  
20 25 30

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr  
35 40 45

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro



2/11

50

55

60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly  
 65 70 75 80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe  
 85 90 95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe  
 100 105 110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe  
 115 120 125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile  
 130 135 140

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr  
 145 150 155 160

Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe  
 165 170 175

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln  
 180 185 190

Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser  
 195 200 205

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp  
 210 215 220

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln  
 225 230 235 240

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser

3/11

245	250	255
Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu		
260	265	270
Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile		
275	280	285
His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro		
290	295	300
Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys		
305	310	315
Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys		
325	330	335
Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro		
340	345	350
Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp		
355	360	365
Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln		
370	375	380
Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr		
385	390	395
His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys		
405	410	415
Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val		
420	425	430
Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala		

4/11

435

440

445

Leu

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

&lt;400&gt; 2

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

&lt;400&gt; 3

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

5/11

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 4

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1

5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 5

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe

1

5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 6

Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

<210> 7

<211> 9

6/11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

&lt;400&gt; 7

Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

&lt;223&gt; Xaa at 1 position stands for Abu.

&lt;400&gt; 8

Xaa Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

&lt;400&gt; 9

Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

7/11

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

&lt;400&gt; 10

Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

&lt;400&gt; 11

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1

5

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

8/11

&lt;400&gt; 12

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu

1

5

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

&lt;400&gt; 13

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu

1

5

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

&lt;400&gt; 14

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu

1

5

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

9/11

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 15

Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu

1

5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 16

Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe

1

5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 17

Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe

1

5

<210> 18

<211> 9



10/11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

&lt;223&gt; Xaa at 5 position stands for Abu.

&lt;400&gt; 18

Arg Tyr Pro Ser Xaa Gln Lys Lys Phe

1

5

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:PCR Primer

&lt;400&gt; 19

ccatgggcag ccattctatg cgctatTTTT cTacctcgt

40

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:PCR Primer

&lt;400&gt; 20

ggatcctggc tccatctca gggTgagggg cTtgggcaga ccctc

45

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

11/11

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:PCR Primer

&lt;400&gt; 21

catatgatcc agcgtacccc gaaaattcag

30

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:PCR Primer

&lt;400&gt; 22

ggatccttac atgtctcgat cccacttaac

30

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009378

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/02, C12N15/00, A61K39/00, A61P35/00,  
G01N15/14, G01N33/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/02, C12N15/00, A61K39/00, A61P35/00,  
G01N15/14, G01N33/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/Geneseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2002-525099 A (Corixa Corp.), 13 August, 2002 (13.08.02), & WO 00/18795 A2 & EP 1117687 A2	45 41-44, 46-49, 59-62
X Y	WO 02/28414 A1 (Corixa Corp.), 11 April, 2002 (11.04.02), & US 2003/0082196 A1 & US 2003/0072767 A1 & EP 1328287 A1 & JP 2004-510425 A	45 41-44, 46-49, 59-62
Y	John D. et al., Phenotypic Analysis of Antigen-Specific T Lymphocytes., Science, Vol.274, Issue 5284, pages 94 to 96 (1996)	41-44, 46-49, 59-62
X Y	WO 03/002142 A1 (Chugai Seiyaku), 09 January, 2003 (09.01.03), & EP 1410804 A1	45 43, 44, 48, 49, 61, 62

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
02 August, 2004 (02.08.04)

Date of mailing of the international search report  
17 August, 2004 (17.08.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009378

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-40, 50-58

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 1 to 40 and 50 to 58 pertain to diagnostic methods practiced on the human body.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009378

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 03/028757 A1 (SUGIYAMA Haruo), 10 April, 2003 (10.04.03), (Family: none)	45 43, 44, 48, 49, 61, 62
X	JP 2003-500004 A (Imperial College Innovations), 07 January, 2003 (07.01.03), & WO 00/26249 A1 & EP 1127068 A1	45

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12Q 1/02、C12N 15/00、A61K 39/00、A61P 35/00、G01N 15/14、G01N 33/48

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12Q 1/02、C12N 15/00、A61K 39/00、A61P 35/00、G01N 15/14、G01N 33/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/Geneseq、  
WPI (DIALOG)、BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 2002-525099 A (Corixa Corp) 2002.08.13 & WO 00/18795 A2 & EP 1117687 A2	45 41-44、46-49、 59-62
X Y	WO 02/28414 A1 (Corixa Corp) 2002.04.11 & US 2003/0082196 A1 & US 2003/0072767 A1 & EP 1328287 A1 & JP 2004-510425 A	45 41-44、46-49、 59-62

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.08.2004

国際調査報告の発送日

17.8.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照

4 N

8 4 1 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## C (続き) . . . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	John, D. et al., Phenotypic Analysis of Antigen-Specific T Lymphocytes. Science, Vol. 274, Issue 5284, pp. 94-96 (1996)	41-44、46-49、 59-62
X Y	WO 03/002142 A1 (Chugai Seiyaku) 2003.01.09 & EP 1410804 A1	45 43、44、48、49、 61、62
X Y	WO 03/028757 A1 (Sugiyama Haruo) 2003.04.10 (ファミリーなし)	45 43、44、48、49、 61、62
X	JP 2003-500004 A (Imperial College Innovations) 2003.01.07 & WO 00/26249 A1 & EP 1127068 A1	45

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1-40, 50-58 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
人体の診断方法に係る発明が記載されている。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。